

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32645
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2023
課題番号：19K10274
研究課題名(和文) 新規がん治療法開発に向けた口腔がん幹細胞における上皮間葉転換抑制因子の機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis of the inhibitor for epithelial-mesenchymal transition on oral cancer stem cells towards the development of new cancer treatments

研究代表者
渡辺 正人 (Watanabe, Masato)

東京医科大学・医学部・兼任准教授

研究者番号：40349460
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：がん治療の成否はがん幹細胞の治療抵抗性に特徴づけられる。がん幹細胞の特性の1つとされる上皮間葉転換を解明することは薬剤感受性を制御する手掛かりとなる。そこで、口腔扁平上皮癌の組織より上皮間葉転換型幹細胞を同定し、更に上皮間葉転換抑制因子ユビキチンリガーゼ(Fbxw7)の存在解明を試みた。本研究はFbxw7による上皮間葉転換への負の作用を基礎レベルで検証するものである。結果、組織レベルでは上皮間葉転換型幹細胞が推察されたが、特性として薬剤抵抗性あるいはFbxw7による上皮間葉転換への有意な負の作用は不明であった。Fbxw7を標的とした分子レベルのバイオマーカーに該当するものはなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特色として、抗腫瘍性の直接的な新規薬物開発に関連するものではない。がん幹細胞の薬剤抵抗性に焦点をあて、いかにがん幹細胞の感受性を高めるかその因子の解明あるいはそれに関連したバイオマーカーの解明を試みた研究である。これまでの抗がん剤あるいは分子標的剤は各増殖期に相応し効果を発揮するが、感受性が低いG0期のがん幹細胞は対象外であった。その為、G0期へ移行を阻止する因子の解明は、薬物療法を補完する観点で興味深い研究であった。

研究成果の概要(英文)：The success or failure of cancer treatment is characterized by the resistance of cancer stem cells to therapy. Elucidating epithelial-mesenchymal transition, which is considered to be one of the characteristics of cancer stem cells, will provide clues for controlling drug sensitivity. Therefore, we attempted to identify epithelial-mesenchymal transition stem cells from oral squamous cell carcinoma tissue and to elucidate the presence of ubiquitin ligase (Fbxw7), an epithelial-mesenchymal transition inhibitor. This study examines the negative effect of Fbxw7 on epithelial-mesenchymal transition at a basic level. As a result, epithelial-mesenchymal transition type stem cells were speculated at the tissue level, however their characteristics, drug resistance or significant negative effects of Fbxw7 on epithelial-mesenchymal transition were unknown. There were no molecular biomarkers targeted to Fbxw7.

研究分野：口腔腫瘍

キーワード：口腔扁平上皮癌 がん幹細胞 上皮間葉転換 ユビキチンリガーゼ microRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔癌治療における化学療法の役割として、induction therapy や一次治療後の再発および転移の予防、治療に貢献する概念が重要視されている。頭頸部癌では一次治療後一年以内での再発、転移の可能性が7割以上あり、その後の予後に大きく影響を与える。いかに再発、転移を制御するかが予後を規定する要因と考えられる。

(2) これまでの薬物療法は増殖している腫瘍実質つまり細胞周期に入っているがん細胞を標的として来た。癌組織は heterogenous であるため理に叶った治療ではあるが、特に進行癌では根治に至ることは困難である。一度腫瘍細胞数が減少するが再度増生する。がん細胞ポピュレーションの中に抵抗性を示す細胞の存在がある為と考えられている。2000年以降各種がん幹細胞の存在が明らかにされてから、この腫瘍形成能を持つ細胞が治療抵抗性を示し、その多くは静止期(G0期)にあることが報告されている。

(3) がん幹細胞の維持に関与するタンパクにユビキチンリガーゼ F-box and WD40 domain protein 7(Fbxw7)が注目されている。これは細胞分裂を促進させる oncoprotein を分解し分裂期を維持する役割がある(Welcker et al. Nat Rev Cancer 2008)。現在、がん幹細胞の特性が各癌種で解明されてきているが、治療に応用する報告は少ない。Fbxw7の阻害により静止期から cell cycleへ追い出し、腫瘍の感受性を高める研究が慢性骨髄性白血病で応用されている(Takeishi et al. Cancer Cell 2013)。

(4) 一方、がん細胞には細胞極性や周囲細胞との接着機能を失い、遊走、浸潤能を獲得することで間葉系様の細胞へ変化するプロセスがあり、これを上皮間葉転換という。上皮間葉転換を起こしている細胞は、幹細胞様の機能を獲得し、これによりがん幹細胞が生じると示唆されている。近年、Fbxw7による上皮間葉転換の抑制作用が指摘されているが、口腔がんでは明らかにされていない。

(5) われわれはこれまで増殖期にあるがん細胞を対象に蛋白レベルで代謝酵素の発現量を算出し、薬剤効果との関係を検討してきた(Watanabe et al. Jpn Head Neck Cancer 2008)。平成25年度より科学研究費助成事業の援助を受け分子レベルで代謝酵素の発現変化を検討して来たが効果判定に寄与する明瞭な結果は得られなかった。今後は薬剤感受性低下の原因をがん幹細胞の1つの表現とされる上皮間葉転換に焦点を当て、その抑制因子を解明することは、より精度を上げ根治性を向上させる新たな治療戦略の開発につながると考えた。本研究はその基礎として捉え将来的に臨床応用へ展開できるよう一貫した研究計画を立案した。

2. 研究の目的

転移症例あるいは予後不良症例の口腔扁平上皮癌を対象として、組織上のFbxw7の発現を分子レベルで検索し、同時に上皮間葉転換マーカーとの負の相関性を検証することである。更にFbxw7発現の多寡に関与するバイオマーカーとして未知の特異的miRNAの探究を目指した。治療抵抗性を示すがん幹細胞の特定と特性について探求すべく以下のことを検討項目とした。

(1) 切除腫瘍組織内からがん幹細胞の単離および上皮間葉転換マーカー発現の検討：切除組織よりALDH酵素活性を測定してALDH発現がん細胞ポピュレーションを単離し、同時に幹細胞マーカーであるCD44の抗体を用いて発現する細胞を選別しがん幹細胞を同定、分離すること。また、上皮間葉転換マーカーであるSnail、Slug、Vimentin、E-Cadherin、-CateninおよびTwistの発現を検出すること。

(2) 上皮間葉転換型細胞に対する薬剤感受性の検討：in vitro環境下で抗癌剤を使用し化学療法に対するviableな細胞数を計測し抵抗性を検討すること。

(3) 切除腫瘍組織を対象とした上皮間葉転換マーカー発現の検討：上記1で使用した抗体を用いて上皮間葉転換マーカーの発現を検討し上皮間葉転換型がん幹細胞のプロファイルを明らかにすること。

(4) 上皮間葉転換型細胞に対するFbxw7の存在の解明：低感受性腫瘍組織上で幹細胞が認識できる部位からDNAを抽出しFbxw7の存在を調べること。

(5) 上皮間葉転換型細胞に対するmiRNAの同定：がん幹細胞組織からmiRNAの発現プロファイルを解析し、発現シグナルが観察されたmiRNAの発現量をreal time RT-PCRで調べること。

(6) Fbxw7におけるmiRNAの標的遺伝子の解明：コンピュータによるmiRNA標的予測法を使用し、標的候補の3'UTRとの相補性を評価して追求すること。

3. 研究の方法

対象は2013年から2015年までに当科を受診された未治療の口腔扁平上皮癌100症例を対象に生検あるいは切除された腫瘍組織からホルマリン固定からパラフィン標本を作製した。また同時に新鮮組織片も採取し準備した。

(1) 切除された癌組織よりコラゲナーゼ処理した細胞を CSC enrich 培地で継代培養後、Aldefluor assay で抗 CD44 抗体を作用させ ALDH 酵素活性を測定し FACS を使用することで ALDH+/CD44+陽性細胞ポピュレーションを同定し単離を試みた。上皮間葉転換マーカーである Snail、Slug、Vimentin、E-Cadherin、 β -Catenin および Twist を対象とした抗体を用い免疫染色法にて発現する上皮間葉転換マーカーを検出した。

(2) 上記1で単離されたがん幹細胞を 96 well プレート上に 5×10^3 cells/well に調整し、抗癌剤を加え 48 時間 37 °C でインキュベートした。その後、生細胞の数を WST-1 proliferation assay Kit (Roche, Mannheim, Germany) で測定し、上皮間葉転換型細胞の抗癌剤抵抗性を検討した。

(3) 上記1で使用した抗体を用いて切除組織上で免疫組織化学的染色法にて発現する上皮間葉転換マーカーを検出した。その発現様式から上皮間葉転換型細胞を組織切片上で特定を図った。

(4) 上記に示す方法で特定された組織上の上皮間葉転換型細胞発現部位より Fbxw7 の検出を試みた。

パラフィン包埋切片をトルイジンブルーで染色し、レーザーマイクロダイセクションを使用して上皮間葉転換型細胞発現部位を分離しサンプリングした後、回収されたサンプルから DNA 抽出キットを用いて DNA の抽出を図った。比較対照としてがん幹細胞以外の腫瘍実質(細胞周期の増殖期)から同様にダイセクションにより DNA の抽出を行って見た。

DNA 抽出後、既知の塩基配列の primer および probe を作製し real time PCR にて増幅し、その後 PCR 産物はアガロースゲル電気泳動にかけ Fbxw7 に特異的なバンドを検索した。

(5) 上皮間葉転換型細胞と増殖期がん細胞の両群で発現する miRNA の違いを調べた。まず、網羅的な発現分析として DNA チップ (3D-Gene® 東レ株式会社) を使った発現プロファイル解析を行い、その発現プロファイルから違いが観察された miRNA をさらに RT-real time PCR 法によって発現量を解析した。miRNA 発現解析のプロトコールは以下に示した。

miRNA 抽出 (total RNA として 5 μ g 以上) 蛍光標識 (Cyanine 3) 反応 ハイブリダイゼーション (micro RNA 検出用オリゴ DNA プローブ) 専用の DNA マイクロアレイスキャナーで蛍光量の解析 画像化

両群のプロファイリング画像の比較 発現シグナルの差が観察される miRNA を同定 RT-real time PCR 法で差が観察された miRNA の発現量を解析

(6) 上記の同定された miRNA の標的遺伝子を解明するにあたり、主にコンピュータによって予想された miRNA の標的に依存しているかは、特定の生物学的経路に關与する miRNA に基づく推測に依存している。特にコンピュータによる miRNA 標的予測法は、miRNA と標的遺伝子との塩基対形成の性質に基づいている。miRNA の標的部位に関しては、5' 端の方が 3' 端よりも標的遺伝子と塩基対形成しやすい傾向がある。まずコンピュータによる標的の解明を試みた。

ヒト miRNA の塩基配列は web 上で公開されている Rfam データベースを、ヒト遺伝子の 3' UTR 塩基配列は同様に Entrez nucleotide データベースから入手した。

web 上で自由にアクセスできる標的予測プログラム miRanda を利用した。miRNA 標的を予測するコンピュータを用いた方法は、miRNA の 5' 端の 2~8 塩基付近の塩基対形成、もしくは miRNA とその標的遺伝子との熱力学的安定性を重視しつつ、miRNA と標的候補の 3' UTR との相補性を評価して予測してみた。

4. 研究成果

(1) 切除腫瘍組織内からがん幹細胞の単離では、安定した継代培養が出来ず、ALDH+/CD44+陽性細胞ポピュレーションの同定では正確性を欠いた。また、上皮間葉転換マーカーの発現において、免疫染色法を用いて 6 種類のマーカーの発現様式を検討したが一定した発現パターンは見出せなかった。

(2) 単離された細胞の性状が不安定な為、薬剤感受性試験の結果は不明瞭となった。

(3) 切除腫瘍組織を対象とした上皮間葉転換マーカー (Snail、Slug、Vimentin、E-Cadherin、 β -Catenin、Twist) 発現の検討では、全てのマーカーで発現を認めた。お互いの発現の強度に相関性が認められた。それぞれのマーカーの発現は治療抵抗性とは関連を示さなかった。

(4) 上記マーカーが発現する上皮間葉転換型細胞相当部位より レーザーマイクロダイセクションを使用して Fbxw7 を想定する DNA をサンプリングしその検出を行った。Fbxw7 に相当するバンドは認められず PCR による検出には至らなかった。

(5) 上皮間葉転換型細胞特有に発現変化する miRNA の同定では、網羅的な発現プロファイル解析の結果、いくつかの miRNA が候補として認められた。その後の PCR で発現量に明確な差が出なかった。発現量から、miR-24、miR-27、miR-92、miR-25、miR-223 が推察された。

(6) 推察された miRNA の標的遺伝子の解明では、3' UTR との相補性を有する遺伝子の解明に至らなかった。少なくとも今回、Fbxw7 に関連した遺伝子は該当しなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Masato Watanabe, Michihide Kono, On Hasegawa, Yoko Kawase-Koga, Daichi Chikazu, Ai Enomoto, Toshitaka Nagao	4. 巻 32
2. 論文標題 Preauricular solitary fibrous tumor: A case report of uncommon neoplasm arising from the facial region	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 195~199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajoms.2019.11.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Masato Watanabe, Ai Enomoto, Yuya Yoneyama, Michihide Kono, On Hasegawa, Yoko Kawase-Koga, Takafumi Satomi, Daichi Chikazu	4. 巻 19
2. 論文標題 Follicular lymphoid hyperplasia of the posterior maxillary site presenting as uncommon entity: a case report and review of the literature	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Oral Health	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12903-019-0936-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	河野 通秀 (Kohno Michihide) (00421066)	東京医科大学・医学部・講師 (32645)	
研究分担者	古賀 陽子 (Koga Yoko) (10392408)	東京医科大学・医学部・兼任教授 (32645)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	近津 大地 (Chikazu Daichi) (30343122)	東京医科大学・医学部・主任教授 (32645)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関